

RÉGÉNÉRATION *IN VITRO* DE L'ARBRE À SUIF (*PENTADESMA BUTYRACEA* SABINE), UNE ESPÈCE LIGNEUSE À USAGES MULTIPLES (LUM) VULNÉRABLE AU BENIN

Houédjissin S.S.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi , Bénin, Calavi

Dangou S.J.

Ecole Polytechnique d'Abomey-Calavi, Bénin, Calavi

Azokpota P.

Laboratoire de Biochimie Microbienne et de Biotechnologie Alimentaires
(LMBA) Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-Calavi,
Cotonou, Bénin

Cacai G.

Agbidinoukoun A.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi , Bénin, Calavi

Hounhouigan D. J.

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Formulations des Aliments
(LAFAB) ; Faculté des Sciences Agronomiques, Université d'Abomey-
Calavi, Cotonou, Bénin

Ahanhanzo C.

Département de Génétique et des Biotechnologies de la Faculté des Sciences
et Techniques de l'Université d'Abomey-Calavi , Bénin, Calavi
Centre Béninois de la Recherche Scientifique et Technique, Bénin, Cotonou

Abstract

This work is done in order to identify the effects of basal media associated with two cytokinins (BAP and zeatin) and suitability for the regeneration of apical and axillary buds *Pentadesma butyracea*. Fragments axillary bud stem and apical bud stem fragment were taken from seedlings *P. butyracea* from seed germination in a greenhouse. After disinfection, explants were cultured on three basic areas: MS (Murashige and Skoog), B5 (Gamborg) and WPM (Woody Plant Medium). The effects of Zeatin and BAP on the bud and bud development were also studied. These *in vitro*

propagation of tests conducted in this species, showed that the apical bud fragments proved to be the most favorable. Among the tested culture media, basal medium Gamborg (B5) is most suited to the entry into operation of apical buds (26.66%). Other WPM and MS basal media also allowed bud but at low rates (20%; 13%). Zeatin (3.5 mg / L) appears best suited to budding and regeneration of apical buds of *P. butyracea* and the formation of leaves per explants. BAP favored the resumption of activity of the apex, but not plant development. Our experiments allow to open a new path consistent multiplication of individuals elites *Pentadesma butyraceae* to produce seeds that can be used for propagation, domestication and conservation of this species.

Keywords: *Pentadesma butyracea*, in vitro regeneration, culture medium, explants, Zeatin, BAP

Résumé:

Ce travail est réalisé dans le but d'identifier les effets des milieux de base associés à deux cytokinines (BAP et zéatine) et l'aptitude à la régénérescence des bourgeons axillaires et apicaux de *Pentadesma butyracea*. Les fragments de tiges à bourgeon axillaire et fragment de tige à bourgeon apical ont été prélevés sur des plantules de *P. butyracea* issues de la germination des graines en serre. Après désinfection, les explants ont été mis en culture sur trois milieux de base : MS (Murashige et Skoog), B5 (Gamborg) et WPM (Woody Plant Medium). Les effets de la Zéatine et de la BAP sur le débourrement et le développement des bourgeons ont été également étudiés. Ces essais de propagation *in vitro*, menés chez cette espèce, ont montré que les fragments à bourgeon apical se sont avérés les plus favorables. Le milieu de base Gamborg (B5) est le plus adapté au débourrement des bourgeons apicaux (26,66%). Les milieux de base WPM et MS ont permis aussi le débourrement mais à des taux faibles (20% ; 13%). La zéatine (3,5mg/L) apparaît la mieux adaptée au débourrement et à la régénérescence des bourgeons apicaux de *P. butyracea* ainsi qu'à la formation des feuilles. La BAP a favorisé la reprise de l'activité de l'apex, mais pas le développement des plants. Nos expérimentations permettent d'ouvrir une nouvelle voie de multiplication conforme de *Pentadesma butyracea* afin de produire des semences pouvant être utilisées pour la propagation, la domestication et la conservation de cette espèce.

Mots clés : *Pentadesma butyracea*, culture in vitro, milieu de culture, explants, Zéatine, BAP

Introduction

L'exploitation du bois, des feuilles, des écorces et des racines des essences forestières pour les besoins quotidiens (bois de service, bois d'énergie, bois d'œuvre et pharmacopée) augmente proportionnellement à la démographie. Ces pratiques anthropiques dégradent le patrimoine forestier entraînant ainsi une diminution progressive des superficies boisées et de la densité des arbres (passage progressive de la forêt sèche à la forêt claire puis à la savane boisée puis à la savane herbeuse). En conséquence, certaines espèces ligneuses sont en voie de disparition soit à cause de la surexploitation soit par l'absence de régénération par semis naturel suite aux passages annuels des feux, soit tout simplement à cause de la disparition de leurs habitats écologiques (N'klo et Ouattara, 2001). Au nombre de ces espèces ligneuses, *Pentadesma butyracea* Sabine (Clusiaceae), occupe une place de choix. Cette espèce est présente à l'état sauvage depuis la Guinée-Bissau jusqu'au Cameroun et à l'extrême ouest de la République Démocratique du Congo. On la rencontre à l'état subspontané aux Seychelles, où il résulte d'une introduction déjà ancienne (Sinsin et Avocèvou, 2003). En effet, *Pentadesma butyracea* est reconnu pour ses utilités sur les plans économique, alimentaire, nutritionnel, sanitaire, social, culturel, cosmétique, pharmaceutique, etc. (Du Y. et Huang, 2008 ; Avocèvou et *al.*, 2009). Le beurre extrait de ses graines est aussi d'une excellente qualité alimentaire, sinon meilleure organoleptiquement que celle du Karité (N'klo et Ouattara, 2001). Les populations résiduelles de cette espèce, déjà rare au Bénin, disparaissent en même temps que les forêts galeries qui l'abritent en raison des facteurs anthropogénétiques et les changements climatiques (Natta et *al.*, 2011). Face à l'importance et aux différentes menaces perceptibles de disparition de cette espèce au Bénin, elle n'est pas encore domestiquée. En effet, la domestication d'une espèce passe fondamentalement par le développement et la maîtrise des techniques de sa propagation (Kouyaté, 2005). En outre, la multiplication de *P. butyracea*, espèce fortement allogame (Ewèdjè, 2012), se fait principalement par la voie sexuée, ce qui entraîne une hétérogénéité des descendants (Okafor, 1971) peu favorable à la multiplication des génotypes productifs. *P. butyracea* peut aussi se multiplier par drageon, par greffage ou bouturage. Mais ces méthodes traditionnelles sont très limitées du fait d'un enracinement difficile et, comme chez la plupart des ligneux, d'un faible taux de reprise après transplantation (Newton et *al.*, 1992). Il s'avère donc indispensable d'explorer d'autres voies de multiplication rapide et d'identification de génotypes élités. La mise au point d'une technique de microbouturage *in vitro* peut donc se révéler importante. Jusqu'à présent, à notre connaissance, la technique du microbouturage *in vitro* n'a pas été testée sur *P. butyracea*. Pourtant, son utilisation pourrait permettre non seulement

de contourner les difficultés de la multiplication végétative traditionnelle, mais aussi de favoriser la multiplication conforme (conservation des génotypes) des individus élites. Comme cela a pu être obtenu chez certains ligneux sauvages tels que *Cola nitida* (Dossa et al., 1994), *Psidium guajava* (Mohamed et al., 1995), *Dacryodes edulis* (Youmbi et Benbadis, 2001), *Irvingia gabonensis* (Ndoumou et al., 2004), *Lannea microcarpa* (Sereme et al., 2014), etc. Le microbouturage *in vitro* ne se limite pas au seul coefficient de rapidité de la multiplication, mais il s'est avéré que les plantes autoracinées *in vitro* sont plus vigoureuses et plus résistantes aux maladies (Cimato, 1999). En outre, les vitroplants peuvent constituer un matériel de choix pour aborder de façon plus efficace certaines études de physiologie, de pathologie ou de génétique. Ainsi, pour maintenir l'intégrité génétique des clones, la mise en culture des microboutures, puis la stimulation des bourgeons axillaires et leur prolifération constituent la méthode la plus généralement appliquée en micropropagation des ligneux (Walali Loudiyi, 1993).

Selon Boccon-Gibod (1980) le choix d'un milieu de culture tient compte de la connaissance de la physiologie de la plante vis-à-vis de la nutrition minérale c'est-à-dire des conditions nutritives les plus favorables à la croissance des explants. Aussi, d'autres travaux ont-ils signalé que la levée de dormance en culture *in vitro* chez les espèces ligneuses serait favorisée par la benzylaminopurine (Boxus, 2003). Par ailleurs, les travaux de Brhadda et al., (2003) ont montré que la Zéatine pouvait être également favorable à l'induction et au développement *in vitro* des bourgeons chez *Olea europaea* qui est une espèce ligneuse. Par ailleurs, Boccon-Gibod, (1980) a montré que les milieux de base MS (Murashige et Skoog, 1962) et B5 (Ganborg et al., 1968) donnent de bons résultats pour beaucoup de culture en l'occurrence la culture des organes végétaux de toutes sortes. Cependant, selon cet auteur, ces milieux ne sont pas universels et ne conviennent pas pour toutes les espèces. De même, le milieu de base WPM (Woody Plant Medium) de McCown et Lloyd (1981) a été utilisé avec succès pour les ligneux comme *Olea europaea* (Brhadda et al., 2003); *Tectona grandis* (Ahanhanzo et al., 2013); *Lannea microcarpa*. (Sereme et al., 2014). De plus, le succès de la culture *in vitro* d'une espèce végétale est influencé par le type d'explants mis en culture (Gubis et al., 2003). S'appuyant sur ces résultats, cette étude présente des essais préliminaires de culture d'apex et de fragment de tige à bourgeon axillaire à partir du matériel juvénile, obtenu par germination des graines, en vue d'approcher quelques techniques de régénération en culture *in vitro* de *P. butyracea*. Elle est basée spécifiquement sur l'étude de l'effet de la composition minérale du milieu de culture et l'influence de l'emploi des régulateurs de croissance substances de

croissance telles que la BAP et la zéatine sur la régénération *in vitro* de *P. butyracea* selon le type d'explants.

Matériel et méthodes

Milieu d'étude

Les travaux de la présente étude ont été réalisés au Laboratoire Central de Biotechnologies Végétales et Amélioration des Plantes. Ce laboratoire est l'un des trois laboratoires du Département de Génétique et des Biotechnologies (DGB) de la Faculté des Sciences et Techniques de l'Université d'Abomey- Calavi (FAST / UAC). L'université est située à 16 km environ au Nord de Cotonou dans la commune d'Abomey-Calavi (2° 20' 30.''1 ; 6° 24' 56'') en République du Bénin.

Préparation du matériel végétal

Les plants-mères ont été obtenus à partir des graines de *Pentadesma butyracea* ensemencées dans des pots en polyéthylène remplis de terreau. Les pots ont été traités avec du carbodan en granulés trois jours avant semis à la dose de 4 g par pot (Dossoukpèvi et *al.*, 2012). Le terreau a été arrosé de manière à maintenir une humidité suffisante pour la germination des graines. Les plantules issues de la germination ont été traitées avec du fongicide (Topsin-M) une semaine avant prélèvement des explants. Les prélèvements des explants pour l'établissement des cultures *in vitro* ont été effectués 90 jours après semis. Ces explants sont constitués de deux types de fragments de tiges : les fragments portant chacun au moins un bourgeon axillaire et ceux pourvus de bourgeon apical (apex). Les explants prélevés des plants-mères en serre sont soigneusement lavés à l'eau courante puis désinfectés. Le protocole de désinfection et les conditions de culture sont ceux utilisés par AL KAÏ et *al.*, (1984). Les explants sont immergés dans de l'alcool à 70° pendant 3 minutes puis trempés pendant 10 minutes dans une solution de chlorure mercurique à 1 g/l additionnée de quelques gouttes de Tween 20. Ils sont ensuite rincés avec une solution de chlorure de calcium à 2,5 g/l afin de limiter la toxicité due au mercure AL KAÏ et *al.*, (1984). Ce dernier rinçage a été suivi de trois rinçages à l'eau distillée stérile de 5 min chacun sous une hotte à flux laminaire horizontal. Après l'élimination d'eau par dépôt des explants sur du papier buvard stérile, les explants morcelés, d'environ 1,5 cm de longueur (à nœud unique pour les fragments à bourgeon axillaire) ont été aseptiquement déposés sur les différents milieux de culture considérés. Les tubes, contenant chacun un explant ont été fermés par du coton stérile et scellés avec du film transparent. Les explants ainsi ensemencés sont mis en culture dans une salle de culture, à une température de 27 ± 1 °C, une photopériode de 12 heures d'éclairage par jour sous une intensité lumineuse de 5000 lux. L'humidité relative de la salle est de 80%.

Milieux de culture *in vitro*

Les milieux de base MS, B5 et WPM ont été choisis pour nos expérimentations afin de déterminer les conditions nutritives les plus favorables à la croissance *in vitro* de *Pentadesma butyracea*. En effet, le milieu de base Murashige et Skoog est riche en NH_4NO_3 (1650mg/L) et KNO_3 (1900mg/L), le milieu de base WPM est riche en K_2SO_4 (990mg/L) et $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (556mg/L) alors que le milieu B5 renferme plus de KNO_3 (2500mg/L). De plus, les milieux de base B5 et WPM sont moins riches en ion total (respectivement $60,2 \cdot 10^{-3}$ mg/L et $41,54 \cdot 10^{-3}$ mg/L) que le milieu de base MS ($93,27 \cdot 10^{-3}$ mg/L). L'autoclavage a lieu pendant 20 minutes à 121°C après ajustement du pH à 5,8 avec le HCl ou le NaOH (0,1N). Les milieux de culture ont été distribués dans des tubes à essai à raison de 15 ml par tube.

Paramètres d'évaluation

Les trois milieux de culture choisis (MS, B5 et WPM) sont testés sans régulateurs de croissance afin d'identifier le milieu optimal pour le débourrement et la régénérescence des explants et le type d'explants de *P. butyracea* (apex, fragment à bourgeon axillaire) répondant mieux en culture *in vitro*. Les milieux de culture ont été enrichis d'une part en Zéatine et d'autre part en benzylaminopurine (BAP) à différentes concentrations (0,5 ; 1,5 ; 2,5 ; 3,5 ; 4, 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) pour étudier l'influence de ces cytokinines sur le débourrement et la croissance (régénérescence et nombre de feuilles formées par explant) des bourgeons présents sur les microboutures prélevées à l'issue de l'expérimentation poursuivie sur 60 jours. Le comptage du nombre de feuilles ouvertes sur chaque vitroplant a été également réalisé à travers les observations et enregistrements quotidiens dans la salle de culture où ont été déposés les tubes ensemencés. Les taux de bourgeons débourrés et régénérés sont calculés par les formules suivantes :

Taux de débourrement (%) = Nombre d'explants débourrés / nombre total de tubes ensemencés par traitement

Taux de régénération (%) = Nombre d'explants régénérés / nombre total de tubes ensemencés par traitement

Analyses statistiques

Un dispositif complètement aléatoire a été adopté. Chacune des expérimentations a été répétée deux fois et a porté sur la mise en culture de 30 explants par traitement. La normalité et l'égalité des variances des données ont été vérifiées respectivement par le test de RYAN-JOINER et de LEVENE. Le test de Newman et Keuls (Dagnelie, 1980) au seuil de 5 % a été utilisé pour le classement des moyennes. Le test T de Student à deux échantillons a été également effectué au seuil de 5% pour l'étude comparée

de l'effet des deux cytokinines (zéatine et BAP) testées. Les graphes ont été construits par le classeur Excel 2010. Les analyses statistiques des résultats ont été effectuées avec le logiciel STATISTICA version 6.31.

Résultats

Réponse des bourgeons apicaux et axillaires au débourrement et à la régénérescence après deux mois de culture sur les trois milieux testés sans régulateurs de croissance

Les résultats obtenus ont montré des réactions très différentes du comportement des explants suivant les milieux de culture utilisés après 60 jours de culture en absence de régulateurs de croissance (figure1). L'analyse de la figure1A montre qu'aucun des milieux de culture n'a favorisé le débourrement des bourgeons axillaires. Par contre, les trois milieux de culture testés ont permis l'entrée en activité des bourgeons apicaux. Cependant, le milieu B5 s'est montré globalement plus réactif avec 26,66% (8 sur 30 explants) de débourrement. La différence avec les deux autres milieux testés (WPM et MS) est très hautement significative ($P < 0,000$). Sur ces milieux, Les pourcentages de débourrement des bourgeons apicaux observés sont de 20% pour le milieu WPM et de 13% pour le milieu MS.

Concernant le taux de régénérescence, la figure1B révèle que seul le milieu de base WPM a permis la régénérescence au niveau des explants à bourgeon apical mais avec un faible taux (6,66%).

A partir de ces résultats, on pourrait retenir que, chez *P. butyracea*, les apex répondent mieux au débourrement que les fragments à bourgeon axillaire et que les milieux de base Gamborg (B5) et WPM peuvent être utilisés respectivement pour le débourrement et la régénérescence de l'espèce.

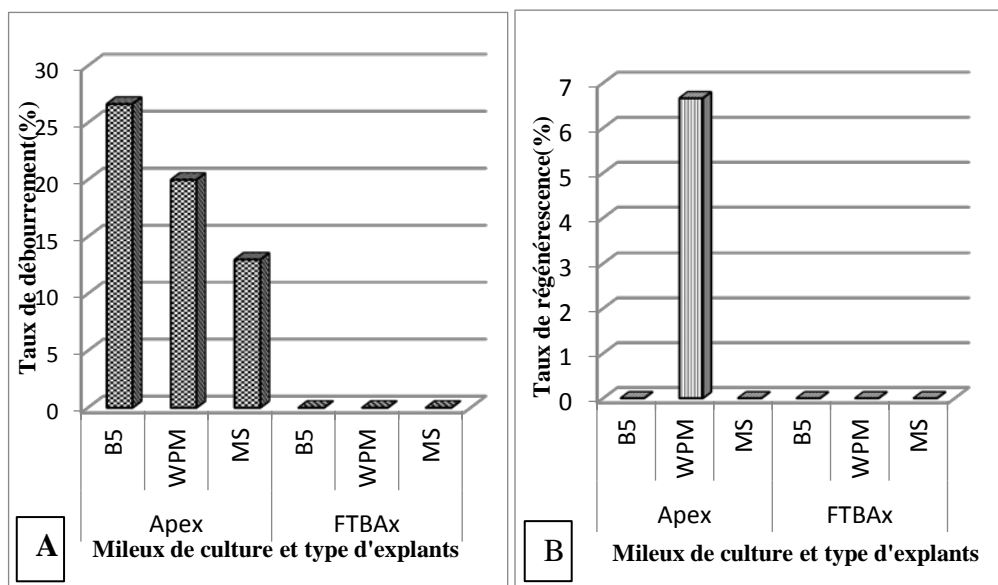


Figure 1 : Effet des trois milieux de base testés sur le débourrement et la régénérescence des plantules à partir de la culture d'apex et de fragment de tige à bourgeon axillaire.

Légende : MS : Murachig et Skoog (1962) ; B5 : Gamborg (1968); WPM : Woody Plant Medium (Lloyd et Mc Cown, 1981) ; BAP : Benzylaminopurine ; FTBAx : Fragment de tige à bourgeon axillaire.

Effet de la zéatine sur le débourrement, la régénérescence et la phylogenèse dans les milieux WPM, MS et B5 après deux mois de culture.

L'analyse du tableau1 montre que la zéatine a significativement favorisé le débourrement des bourgeons apicaux ($P \leq 0,000$). La concentration de 3,5mg/L de zéatine a donné le meilleur taux de débourrement sur les trois milieux de base testés ($53,33 \pm 0,01\%$ sur MS ; $46,67 \pm 0,00\%$ sur B5 et WPM). On y observe également que le plus faible taux moyen de débourrement est obtenu avec 1,5mg/L de zéatine ($6,67 \pm 0,02\%$ sur MS ; $13,33 \pm 0,00\%$ sur B5 et WPM). Par ailleurs, on remarque une diminution du taux de débourrement avec 4,5mg/L de zéatine ($33,33 \pm 0,01\%$ sur WPM, $40,05 \pm 0,07\%$ sur B5 et MS).

L'observation après deux mois de culture a montré que les concentrations de 2,5mg/L et 3,5mg/L de zéatine ont favorisé la régénérescence des bourgeons apicaux sur les trois milieux de culture avec respectivement un taux moyen maximal de $20,00 \pm 0,01\%$ sur MS et $26,67 \pm 0,01\%$ sur B5. Les concentrations de 0,5mg/L et de 4,5mg/L de zéatine ont permis chacune la régénérescence sur deux des milieux testés et à des taux faibles. Pour 0,5mg/L de zéatine, le taux de régénérescence est de

6,67±0,01% sur les milieux MS et WPM alors qu'avec 4,5mg/L de zéatine la régénérescence a été observée sur les milieux MS et B5 avec un taux de 13,32±0,01%. Quant à la concentration de 1,5mg/L de zéatine, elle est plus défavorable à la régénérescence des bourgeons apicaux. Elle a permis seulement la régénérescence sur le milieu MS avec un faible taux de 6,67±0,01%. Le test de Newman et keuls au seuil de 5% a montré l'existence d'une différence hautement significative ($P \leq 0,000$) entre l'effet des cinq concentrations de zéatine testées sur le débourrement des apex d'un milieu de culture à un autre.

Pour le nombre moyen de feuilles, nous avons noté que 3,5mg/L de zéatine a permis la formation de feuilles dans les trois milieux de culture (0,27±0,18 sur B5 ; 0,13±0,13 sur MS et WPM). Cependant, le nombre moyen élevé de feuilles (0,46±0,25) est obtenu avec 2,5mg/L de zéatine dans le milieu MS. La concentration de 0,5mg/L de zéatine n'a pas été favorable à la phylogenèse. Le test de Newman et keuls au seuil de 5% a montré que cette différence observée sur la phylogenèse entre les cinq concentrations testées n'est pas significative ($P > 0,05$) d'un milieu un autre.

Ces résultats révèlent donc que la concentration de 3,5mg/L de Zéatine est favorable au débourrement et à la régénérescence des bourgeons apicaux de *P. butyracea* ainsi qu'à la formation des feuilles par les vitroplants (figure2).

Tableau : Effet de la zéatine sur les apex de *P. butyracea* cultivés dans les milieux WPM, MS et B5 après deux mois de culture.

Zéa (mg/L)	MS			B5			WPM		
	TMD%	TMR%	NF	TMD%	TMR%	NF	TMD%	TMR%	NF
0,5	6,67 ±0,02c	6,67 ±0,01c	0,13 ±0,13a	20,00 ±0,00c	0,00 ±0,00c	0,00 ±0,00a	20,00 ±0,01c	6,67 ±0,01b	0,00 ±0,00a
1,5	6,67 ±0,02c	6,6 7±0,01c	0,13 ±0,13a	13,33 ±0,0d	0,00 ±0,00c	0,00 ±0,00a	13,33 ±0,01d	0,00 ±0,00c	0,13 ±0,13a
2,5	40,00 ±0,01b	20,00 ±0,01a	0,46 ±0,25a	20,00 ±0,00c	13,33 ±0,01b	0,20 ±0,14a	33,33 ±0,01b	6,67 ±0,01b	0,00 ±0,00a
3,5	53,33 ±0,01a	6,67 ±0,01c	0,13 ±0,13a	46,67 ±0,00a	26,67 ±0,01a	0,27 ±0,18a	46,67 ±0,01a	20,00 ±0,01a	0,13 ±0,13a
4,5	40,05 ±0,07b	13,32 ±0,01b	0,13 ±0,13a	40,00 ±0,00b	13,33 ±0,01b	0,13 ±0,13a	33,33 ±0,01b	0,00 ±0,00c	0,00 ±0,00a
Moy.	29,33 ±6,38	10,67 ±1,17	0,20 ±0,07	27,99 ±4,31	10,66 ±3,32	0,12 ±0,05	29,33 ±3,87	6,67 ±2,43	0,12 ±0,1
CV%	68,80	52,67	35	48,69	98,59	41,67	41,77	36,43	50
Pr	0,000** *	0,000** *	0,520n s	0,000** *	0,000** *	0,412n s	0,000** *	0,000** *	0,492n s

Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %. * Moyenne significative ; **moyenne hautement significative ; ***

moyenne très hautement significative ; ns : non significatif ; CV% : coefficient de variation ; Pr : probabilité ; Moy. : moyenne ; Zéa : Zéatine

Effet de la BAP sur le débourrement, la régénérescence et la formation des feuilles dans les milieux WPM, MS et B5 après deux mois de culture.

Après soixante (60) jours de culture *in vitro*, les résultats montrent qu'il existe une différence très hautement significative au seuil de 5% d'une concentration de BAP à une autre pour le taux moyen de débourrement des explants sur les trois milieux de culture utilisés (tableau2). Le taux moyen de débourrement le plus élevé obtenu est de $33,33 \pm 0,01\%$ avec les concentrations de 1,5mg/L et de 3,5mg/L de BAP respectivement dans les milieux de base B5 et WPM. Par ailleurs, on a noté que toutes les concentrations de BAP testées ont permis le débourrement dans les milieux B5 et WPM. Cependant, on observe dans le milieu B5 une augmentation du taux de débourrement lorsqu'on passe de 0,5mg/L à 1,5mg/L de BAP mais à partir de 2,5mg/L le taux a diminué. De même dans le milieu WPM, on remarque que le taux est resté constant ($13,33 \pm 0,01\%$) de 0,5mg/L à 2,5mg/L de BAP puis a pratiquement doublé ($33,33 \pm 0,01\%$) à 3,5mg/L de BAP mais a diminué à 4,5mg/L. Ceci traduit donc que la concentration de 4,5mg/L de BAP n'est pas favorable à l'entrée en activité des explants.

Par rapport à la régénérescence, nous n'avons noté de régénération qu'avec 2,5mg/L de BAP dans le milieu B5 mais à un faible taux ($6,67 \pm 0,04\%$).

Concernant la phylogénèse, en présence de BAP, aucune des cinq concentrations de BAP testées n'est favorable. On déduit alors de ces résultats que les concentrations de 1,5mg/L et 3,5mg/L de BAP ont plus favorisé le débourrement des explants.

Tableau 2 : Effet de la Benzylaminopurine (BAP) sur les apex de *P. butyracea* cultivés dans les milieux WPM, MS et B5 après deux mois de culture.

BAP (mg/L)	MS			B5			WPM		
	TMD%	TMR%	NF	TMD%	TMR%	NF	TM%	TM%	NF
0,5	6,67 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	6,67 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00b$	0,00 $\pm 0,00$	13,33 $\pm 0,01b$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
1,5	6,67 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	33,33 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00b$	0,00 $\pm 0,00$	13,33 $\pm 0,01b$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
2,5	0,00 $\pm 0,00b$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	26,67 $\pm 0,01a$	6,63 $\pm 0,04a$	0,00 $\pm 0,00$	13,33 $\pm 0,01b$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
3,5	6,67 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	6,67 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00b$	0,00 $\pm 0,00$	33,33 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
4,5	6,67 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	20,00 $\pm 0,01a$	0,00 $\pm 0,00b$	0,00 $\pm 0,00$	13,33 $\pm 0,01b$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
Moy.	5,34 $\pm 0,88$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$	18,66 $\pm 0,01$	1,33 $\pm 0,88$	0,00 $\pm 0,00$	17,33 $\pm 2,66$	0,00 $\pm 0,00$	0,00 $\pm 0,00$
CV%	52,62	-	-	60,23	66,61	-	48,64	-	-
Pr	0,000***	-	-	0,000***	0,000***	-	0,000***	-	-

Les pourcentages suivis par la même lettre ne sont pas significativement différents selon la méthode de Newman et Keuls au seuil de 5 %; *** moyenne très hautement significative ; **CV%** : coefficient de variation ; **Pr** : probabilité ; **Moy.** : Moyenne ; **BAP** : Benzylaminopurine

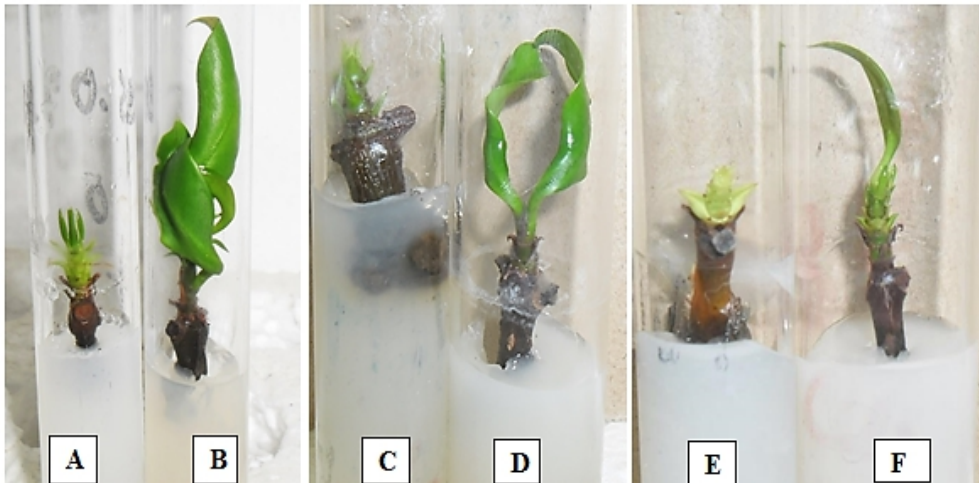


Figure 2: Vitroplants de *Pentadesma butyracea* Sabine sur milieux B5, WPM et MS

A : vitroplant sur B5 + 3,5mg/L BAP ; **B** : vitroplant sur B5 + 3,5mg/L Zéatine ;
C : vitroplant sur WPM + 3,5mg/L BAP ; **D** : vitroplant sur WPM + 3,5mg/L Zéatine ;
E : vitroplant sur MS + 3,5mg/L BAP ; **F** : vitroplant sur MS + 3,5mg/L Zéatine

Effet comparé des deux cytokinines (BAP et Zéatine) sur le débourrement, la régénérescence et la formation de feuilles

Le test T de Student effectué montre qu'à concentration égale, les deux cytokinines (zéatine et BAP) testées ont des effets très significativement différents ($P \leq 0,001$) sur le débourrement, la régénérescence et la formation des feuilles par les vitroplants. De l'analyse de la figure 3, on note que la BAP n'a permis que le débourrement des explants sur les trois milieux testés alors que la zéatine apparaît la mieux adaptée au débourrement, à la régénérescence des bourgeons apicaux de *P. butyracea* ainsi qu'à la formation des feuilles par les explants sur les trois milieux testés (figures 3A, B et C.) Par ailleurs, notons qu'en présence de la zéatine ou de la BAP, les milieux de base Gamborg (B5) et WPM se révèlent être plus favorables au débourrement et à la régénérescence des bourgeons apicaux.

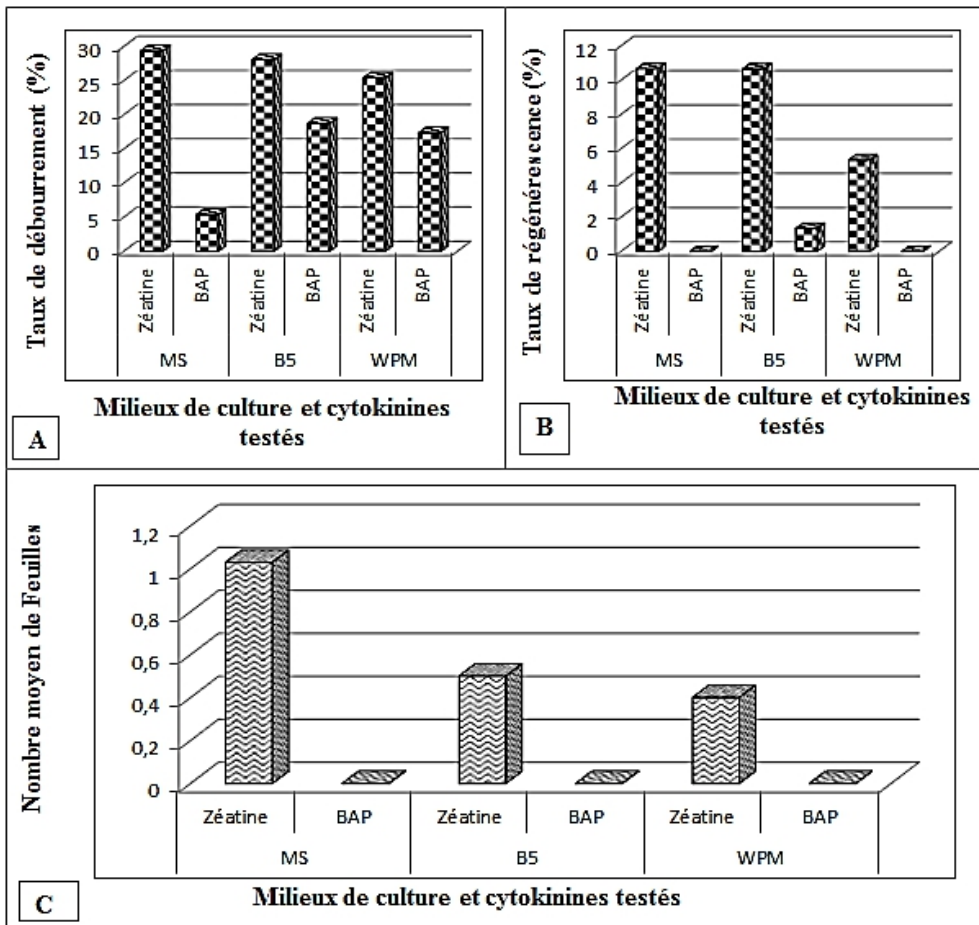


Figure3: Effet comparé des deux cytokinines sur le débourrement, la régénérescence et la formation de feuilles dans les milieux MS, B5 et WPM.

Légende : NF : Nombre de feuilles ; MS : Murachig et Skoog (1962) ; B5 : Gamborg (1968); WPM : Woody Plant Medium (Lloyd et Mc Cown, 1981) ; BAP : Benzylaminopurine

Discussion

Nos travaux ont permis de définir les conditions nutritives favorables au débourrement et à la régénérescence, *in vitro* et à la phylogenèse de *P. butyracea*. Ces paramètres ont varié en fonction du milieu de culture, du type d'explant, de la nature et de la concentration des phytohormones utilisées. Ainsi, au cours de ce travail, il a été observé que les fragments de tige à bourgeon apical présentent une aptitude à la régénération *in vitro* de *P. butyracea* contrairement aux fragments de tige à bourgeons axillaires. Cette réponse pourrait être expliquée par l'âge du plant-mère, ce qui n'est pas probable puisque les plant-mères utilisés dans la présente étude sont des plantes jeunes capables de fournir des explants les plus réactifs. S'appuyant

sur les observations de Gubis *et al.*, (2003) qui ont révélé que les diverses parties d'une plante présentent des capacités de régénération différentes, cette différence de réaction entre les bourgeons apicaux et axillaires pourrait être expliquée par leur localisation et leur âge sur la plante-mère. Ce qui a confirmé les travaux de Gitonga *et al.*, (2008) qui ont prouvé que l'âge de l'explant a une influence sur sa performance en culture *in vitro*. En effet, ces auteurs ont montré chez *Macadamia* spp que les explants nodaux de la 1ère, 2ème et 3ème position nodale de la tige étaient plus appropriés à la culture *in vitro* que ceux obtenus à partir de la 4e, 5e et 6e position nodale. Des résultats similaires ont été obtenus par Buvat (1955) qui a signalé que le méristème apical qui constitue le bourgeon apical ou apex, d'une plante est situé dans une zone sub-apicale, où un massif circulaire de cellules subit des mitoses très fréquentes. En dessous de cette zone, les cellules se divisent aussi, mais à des rythmes décroissants à mesure que l'on s'éloigne de l'anneau initial.

Les milieux de base Gamborg (B5) et WPM se révèlent être plus favorables au débourrement des bourgeons apicaux de *P. butyracea* en absence de régulateur de croissance. Par contre, le milieu de base MS a peu d'influence sur l'entrée en activité des bourgeons apicaux de *P. butyracea*. Ces résultats sont contraires à ceux rapportés par Pitekelabou *et al.*, (2013) qui ont montré que *Nauclea latifolia* qui est une ligneuse s'est bien développée sur les milieux de Murashige et Skoog (MS) et de Lloyd et McCown (WPM : wood plant medium). Ils ne s'accordent non plus avec ceux rapportés par Semere *et al.*, (2014) qui ont obtenu avec le milieu WPM, une nette régénération chez *Lannea microcarpa*. Les milieux testés diffèrent donc essentiellement par leur teneur en azote, en potassium, en ammonium, en nitrates et en ion total. Ainsi, la différence de la reprise et du développement de l'apex de *P. butyracea* observée entre les milieux de culture utilisés (B5, MS et WPM) découlerait certainement de la différence dans leur composition minérale surtout les ions K^+ , NO_3^- et NH_4^+ qui selon (Boccon-Gibod, 1980) ont des influences prépondérantes sur la croissance des tissus cultivés. Brhadda *et al.*, (2003) ont fait des observations similaires dans le cas de certains milieux, notamment WPM, 1/2 Miller et Knop-Heller ayant manifesté un faible débourrement. Selon ces auteurs, l'effet d'un milieu de culture résulte de l'ensemble des interactions des différents éléments qui le composent. Certains d'entre eux stimulent les processus du développement *in vitro*, d'autres par contre ont peu d'influence sur le débourrement. En outre, Manzanera *et al.*, (1990) ont montré que les milieux à concentrations faibles en ions sont plus souhaitables pour la croissance et la prolifération des explants de *Quercus suber* eu égard à d'autres milieux riches en ions. Cela veut dire que les jeunes explants n'ont pas besoin d'un milieu très riche en minéraux (MS). Ces résultats montrent que la croissance

in vitro des bourgeons apicaux de *P. butyracea* aurait des besoins spécifiques vis-à-vis des ions K^+ et NO_3^- . Par ailleurs, en présence de la zéatine ou de la BAP, les milieux de base Gamborg (B5) et WPM se révèlent être plus favorables au débourrement et à la régénérescence des bourgeons apicaux. Par contre, le milieu de base Murashig et Skoog (MS) n'est favorable au débourrement, à la régénérescence et à la formation des feuilles par les vitroplants qu'en présence de Zéatine. Ces résultats confirment ceux de plusieurs auteurs (Leva *et al.*, 1992, Cozza *et al.*, 1997, Etse *et al.*, 2011, Cordeiro *et al.*, 2012) qui ont montré que le succès de la culture *in vitro* d'une espèce végétale est influencée par plusieurs facteurs dont le milieu de culture et la présence de phytohormones exogènes. Des observations similaires ont été également faites par De Los Santos-Briones & Hernandez-Sotomayor, (2006). Ces auteurs ont confirmé que la composition en régulateurs de croissance du milieu sur lequel l'explant est initié joue un rôle crucial dans la régénération des cellules.

En ce qui concerne l'effet des cytokinines, notre étude a montré que la zéatine se révèle être plus favorable au débourrement, à la régénérescence des bourgeons apicaux et à la formation des feuilles par les explants que la benzylaminopurine (BAP) chez *P. butyracea*. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Elliot (1971) et de Brhadda *et al.*, (2003) qui ont révélé respectivement que la zéatine, substance naturelle, très peu signalée dans la littérature, induit le développement des bourgeons axillaires de certains pommiers et stimule la croissance des tiges des microboutures chez *Olea europea*. Mais ils sont contraires à ceux rapportés par Juncker et Favre (1994), EL KBIACH *et al.*, (2002) qui ont montré que la zéatine réduit le développement des bourgeons chez divers Chênes. Ces résultats ne s'accordent non plus à ceux obtenus chez la plupart des espèces ligneuses comme *Irvingia gabonensis* (Ndoumou *et al.*, 2003), *Bacopa monneiri* (Fotso *et al.*, 2004), *Olea europea* (Ali *et al.*, 2009), *Macadamia* Spp. (Gitonga *et al.*, 2008), *Nouclea latifolia* (Pitekellabou *et al.*, 2013) ou *Tectona grandis* (Ahanhanzo *et al.*, 2013) où la BAP est la cytokinine plus utilisée. Ces résultats indiquent que le facteur génétique est déterminant dans le choix du milieu de culture et du régulateur de croissance à utiliser, ce qui nécessite l'adaptation de la composition en sels minéraux et en régulateur de croissance du milieu de culture au cultivar à multiplier.

Conclusion

Les résultats obtenus montrent que les fragments de tige à bourgeon apical présentent une meilleure aptitude à la régénération *in vitro* de *P. butyracea*. Les milieux de base Gamborg (B5) ou de Lloyd et McCown (WPM : wood plant medium) peuvent être utilisés pour la régénération *in vitro* de *P. butyracea*. La zéatine (3,5mg/L) apparaît la mieux adaptée au

débourrement et à la régénérescence des bourgeons apicaux de *P. butyracea* ainsi qu'à la formation des feuilles par les explants. Par ailleurs, les plantules sur lesquelles nous avons pratiqué la culture *in vitro* de *P. butyracea* proviennent de la germination des graines dont nous ne connaissons pas le génotype. Il faudrait donc développer une procédure efficace et reproductible en vue de régénérer par culture *in vitro* des plantules entières de *P. butyracea* à partir d'organes végétatifs âgés ou rajeunis à caractéristiques agronomiques et génétiques connues. Cette étude montre donc que la régénération des plants de *P. butyracea* peut se faire par la technique de culture *in vitro* permettant ainsi la mise en place des stratégies efficaces d'amélioration de cette espèce.

References:

- Ahanhanzo C., Adoukonou-Sagbadja H., Yehouessi W., Ahoton L., Ganglo J.C., Agassounon Djikpo-Tchiboza M., Agbidinokoun A. et Agbangla C. (2013) : Étude de l'influence du chlorure mercurique sur la survie *in vitro* d'explants et de l'aptitude à la régénération de teck (*Tectona grandis* L. f., Verbenaceae). *Journal of Applied Biosciences* 65:4935 – 4944 ISSN 1997–5902
- Al Kaï H., Salesses G., Mouras A. (1984) : Multiplication *in vitro* du noisetier (*Corylus avellana* L., *Agronomie*, 4(4), 399-402
- Ali A., Ahmad T., Akhtar Abbasi N., Ahmed Hafiz I. (2009): Effect of different media and growth regulators on *in vitro* shoot proliferation of olive cultivar 'moraiolo'. *Pak. J. Bot.*, 41(2): 783-795.
- Avocevou-Ayisso C., Sinsin B., Adegbidji A.G., Dossou P. et Damme V. (2009): Sustainable use of non-timber forest products: Impact of fruit harvesting on *Pentadesma butyracea* regeneration and financial analysis of its products trade in Benin. *Forest Ecology and Management*, 257, 1930-1938.
- Boccon-Gibod J. (1980) : Régénération du crosne du Japon (*Stachys sieboldii* Miq.) par culture de méristèmes : multiplication et conservation *in vitro* des clones. In : Congrès sur "l'application de la culture *in vitro* à l'amélioration des plantes potagères", EUCARPIA section légumes, Versailles, 16-18 avril, 31-41.
- Boxus P. (2003) : La micropropagation proprement dite, in: Demarly Y., *Multiplication végétative* :
- Brhadda N., Abousalim A., Walali L.D.M. (2003) : Effets du milieu de culture et de la lumière sur l'embryogenèse somatique de l'olivier (*Olea europaea* L.) cv Picholine marocaine. *Fruit* 85 (3), p. 1–14.
- Buvat R. (1995) : Le méristème apical de la tige. *Ann Bio!* 1955 ; 31 : 596-656. *Cell Rep.* 14 525–528.

- Cimato A. (1999) : Propagation et certification des plants. L'élevage des plants d'olivier en pépinière. Actes du séminaire international sur les innovations scientifiques et leur application en oléiculture et oléotechnie, 10-12 mars 1999. Florence, Italie : Conseil oléicole international, p. 1–30.
- Cordeiro S.Z., Simas N. K., Henriques A. B., Lage C.L.S. and Sato A. (2012): Micropropagation of *Mandevilla moricandiana* (A.DC.) Woodson. In *Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 48, 620-626. DOI 10.1007/s11627-012-9477-5
- Cozza R., Turco D., Briccoli-Bati C. and Bitonti B. (1997): Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Pl. Cell Tissue Organ Cult.*, 51: 215-223.
- Dagnelie P. (1980) : Théorie et méthodes statistiques. II. Applications agronomiques. Gembloux, Belgique : Les Presses agronomiques de Gembloux, 463 p.
- De Los Santos-Briones C. et Teresa Hernández-Sotomayor S. M. (2006) : Coffee biotechnology ; *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1):217-227
- Dossa E.L., Bertrand B., Aidam A. (1994) : Microbouturage *in vitro* du *Cola nitida* (Schott et Endlicher), *Café Cacao Thé* 38 (1) 57–60.
- Dossoukpèvi R.; Ahanhanzo C.; Adoukonou-Sagbadja H.; Cacaï G.; Naïtchédé H. et Agbangla C. (2012) : Contribution à l'amélioration de la production *in vitro* de deux espèces d'*Ocimum* spp (*Lamiaceae*): *Ocimum basilicum* et *Ocimum gratissimum* cultivées au Bénin
- Du Y. & Huang Z. (2008): Effects of seed mass and emergence time on seedling performance In *Castanopsis chinensis*. *For. Ecol. Manag*, 255: 2495-2501.
- edulis*, *Fruits* 55 (2000) 409–419.
- El Kbiach M.L., Lamarti A., Abdali A., Badoc A. (2002) : Culture *in vitro* des bourgeons axillaires de chêne-liège (*Quercus suber* L.) I - Influence des cytokinines sur l'organogenèse et la callogenèse de noeuds de plantules. - *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 141(1-4), 73-88.
- Elliot R.F. (1971) : *N2. J. Bot.* 10: 254-258
- Etsè K.D., Aidam A.V., De Souza C., Creche J. and Lanoue A. (2011) : *In vitro* propagation of *Zanthoxylum zanthoxyloides* Lam., an endangered African medicinal plant. *Acta Botanica Gallica* 158 (1), 47-55
- Ewédjè E.B.K. (2012) : Biologie de la reproduction, phylogéographie et diversité de l'arbre à beurre *Pentadesma butyracea* Sabine (*Clusiaceae*) : Implication pour sa conservation. Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles. 227 p.
- Fotso, Danfagsiteli T.N., Mbouna D., Omokolo N.D. (2004) : *In vitro* propagation of *Ricinodendron heudelotii* by cuttings. *Fruits* 59 (5), 351-358
- Gamborg, O.L., Miller R.A. et Ojima K. (1968): Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50:148-151.

- Gitonga L.N., Kahangi E.M., Gichuki S.T., Ngamau K., Muigai A.W.T, Njeru E.S., Njogu N., Wepukhulu S. (2008): Factors influencing the *in vitro* shoot regeneration in *Macadamia integrifolia*. *Afr. J. Biotechnol.*, 7(22): 4202-4207.
- Gubis J, Lajchová Z, Fragó J., Jureková Z. (2003): Effect of explant type on shoot regeneration in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *in vitro*. *Czech. J. Plant. Breed.*, 39(1): 9-14.
- Heller R. (1953) : Recherches sur la nutrition minérale des tissus cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Biol. Vég.* 14,p. 1–223.
- Juncker B. et Favre J.M. (1994): Long-term effects of culture establishment from shoot-tip explants in micropropagating oak (*Quercus robur* L.). - *Ann. Sci. For.*, 51(6), 581-588.
- Kouyate Amadou Malé. 2005. Aspects ethnobotaniques et étude de la variabilité morphologique, biochimique et phenologique de *Detarium microcarpum* Guill. & Perr. au Mali. PhD en Biosciences Ingénieurs Section Agronomie.Faculteit Bioingenieurs Wetenschappen. 207p.
- Leva A.R., Petrucci R., Panicucci M. (1992): Ruolo di alcuni microelementi carboidrati nella proliferazione *in vitro* di cv Di olivo (*Olea europea* L) Atti quattita olio extravergine di oliva, Firenze, 1-3, 333pp
- Manzanera J.A. et Pardos J.A. (1990): Micropropagation of juvenile and adult *Quercus suber* L. *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 21, 1 – 8
- McCown B.H., Lloyd G. (1981): Woody plant medium (wpm) – A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. - *HortScience*, 16(3), 453.
- Miller M. O. (1967): Cytokinines in *Zea mays*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 144, p. 250–257.
- Mohamed-Yassen Y., Barriviger S.A., Schnell R.J., Splittstoesser W.E. (1995): *In vitro* shoot proliferation and propagation of guava (*Psidium guajava* L.) from germinated seedlings, *Plant*
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue culture. - *Physiol. Plant.*, 15(3), 473-497.
- N’Klo et Ouattara. (2001) : Situation des ressources génétiques forestières de la Côte d’Ivoire (Zone de Savanes). Atelier sous-régional FAO/IPGRI/CIRAF sur la conservation, la gestion, l’utilisation durable et la mise en valeur des ressources génétiques forestières de la zone sahélienne (Ouagadougou, 22-24 sept. 1998).
- Natta A. K., Adomou A. C., Tchabi V. I., Sogbegnon A. R, Mensah G. A. et Sinsin B. A. (2011) : Inventaire, typologie et structure des populations naturelles de *Pentadesma butyracea* (Clusiaceae) de la chaîne de l’Atacora au Nord-Ouest du Bénin *Bulletin de la Recherche Agronomique du Bénin Numéro 70 – Décembre 2011*

- Ndoumou D.O, Fotso, Oumar, Mbouna. (2004): Propagation d'*Irvingia gabonensis* par microbouturage *in vitro*. *Fruits*, 59: 31–38.
- Newton A.C., Mesén J.F., Dick Mc P., Leaky R.R.B. (1992): Low technology of propagation of tropical trees: rooting physiology and its practical implications, in: Mass production technology for genetically Improved. Fast Growing forest Trees species, Afocel, Nangis, France, pp. 417–424.
- Okafor J.C. (1971): Interim report on breeding of some Nigerian food trees, in: Leakey and Newton (Eds.), Proc. 2nd Annu. Conf. For Agroforest. Zaria, Nigeria, pp. 151–162.
- Pitekélabou R., Etse D. K. et Aïdam A.V. (2013) : Micropropagation et rhizogenèse *in vitro* chez *Nauclea latifolia* smith (Rubiaceae). European Scientific Journal, 9 (24) : 296- 307.
- Sereme A., MILLOGO J., Guinko S., Nacro M. (2014): Micropropagation of a West African wild grape (*Lannea microcarpa*) International Journal of Biological and Chemical Sciences. 8(3): 862-870,
- Sinsin B. et Avocèvou C. (2003) : *Pentadesma butyracea*. In van der Vossen, H.A.M. & Mkamilo, G.S.(Editors). Plant Resources of Tropical Africa 14. Vegetable oil. PROTA Foundation, Wageningen, Netherlands / Backhuys Publishers, Leiden, Netherlands /CTA, Wageningen, Netherlands. Pp. 135-137
- Walali Loudiyi D.M. (1993): La multiplication *in vitro* des espèces ligneuses : état actuel et perspectives de développement. Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes ? AUPELF-UREF. Paris : John Libbey Eurotext.
- Youmbi E. et Benbadis A. (2001) : Régénération *in vitro* de plants à partir des bourgeons axillaires et de l'apex de plantules sexuées de *Dacryodes edulis* (Don) Lam., *Fruits* 56 (5) 333–343.